

Inhaled nanomaterials

Citation for published version (APA):

Braakhuis, H. M. (2016). *Inhaled nanomaterials: dose metrics for risk assessment*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20160127hb>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160127hb](https://doi.org/10.26481/dis.20160127hb)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Nederlandse samenvatting

INLEIDING

Nanotechnologie is het gebruik van zeer kleine stoffen of structuren waarmee nieuwe producten en toepassingen gecreëerd worden. De term 'nano' komt van het Griekse woord νᾶνος, dat 'dwerg' betekent. 'Nano' wordt gebruikt om de grootte van kleine structuren aan te geven. Volgens de definitie van de Europese Commissie spreken we van een nanomateriaal als het deeltje in één of meer dimensies kleiner is dan 100 nm (Commission, 2011). Één nanometer is een miljardste meter: 1 nm is 80.000 keer kleiner dan de diameter van een menselijke haar en een vingernagel groeit ongeveer 1 nm per seconde. De term nanomaterialen is een container begrip. Het enige wat nanomaterialen gemeenschappelijk hebben is dat ze allemaal klein zijn. Daarnaast kunnen nanomaterialen verschillen in allerlei eigenschappen. Ze kunnen verschillen in grootte, vorm, kleur, coating en chemische samenstelling. Doordat nanomaterialen zeer klein zijn, hebben ze een relatief groot oppervlak, waardoor ze bijzondere eigenschappen hebben. Ze worden bijvoorbeeld gebruikt om efficiënte zonnecellen, vuilafstotend textiel, medicijnen tegen kanker en snelle computers te maken.

Er zijn nu ruim 1500 consumenten producten waarvan de makers beweren dat deze nanomaterialen bevatten (Nanotechnologies, 2014). Hiervan zijn ongeveer 300 producten voor de persoonlijke verzorging. De verwachting is dat dit aantal snel zal stijgen, nu er wereldwijd veel onderzoek wordt gedaan naar nieuwe toepassingen van nanomaterialen. De stijging in het aantal producten dat nanomaterialen bevat roept de vraag op of deze materialen gevaarlijk kunnen zijn voor werknemers, consumenten en/of het milieu.

RISICOBEOORDELING VAN NANOMATERIALEN

Om de mogelijke risico's van nanomaterialen voor de gezondheid te onderzoeken, is er informatie nodig over zowel de blootstelling aan als mogelijke nadelige effecten van nanomaterialen. In deze thesis ligt de focus op mogelijke risico's van nanomaterialen na inademing. Nanomaterialen kunnen namelijk ingeademd worden tijdens productie of bij gebruik ervan in sprays (Oomen et al., 2011, Wijnhoven et al., 2010). Bovendien zijn de longen gevoeliger dan bijvoorbeeld de huid. Een aantal onderzoeken naar de effecten van nanomaterialen na inademing laat zien dat sommige nanomaterialen ontstekingen in de longen kunnen veroorzaken (eg. Ji et al., 2007, Pauluhn, 2011, Sung et al., 2009, Yang et al., 2008, Oberdorster et al., 2000, Warheit et al., 2007c, Warheit et al., 2007b, Pauluhn, 2009a).

Binnen de risicobeoordeling van stoffen en nanomaterialen is dosimetrie belangrijk. Dosimetrie is de bepaling van de dosering. Meestal wordt de dosering uitgedrukt in massa (gram) per eenheid lichaamsgewicht (kg) of massa per volume in lucht of water (L of m³). Voor oplosbare stoffen bestaat er een vast getal voor het aantal opgeloste moleculen/ atomen per massa eenheid: de constante van Avogadro ($6.02214179 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$). Voor nanomaterialen bestaat een dergelijk vast nummer niet, omdat nanomaterialen kunnen verschillen in grootte, vorm, lading en coating. Het aantal deeltjes, de totale oppervlakte en het volume van een nanomateriaal kan verschillen ook al is de massa gelijk. Bij een gelijke massa gedragen nanomaterialen zich anders dan hetzelfde materiaal in de 'bulk' vorm. Verschillende studies hebben aangetoond dat massa inderdaad niet geschikt is als dosismaat om het effect van nanomaterialen te beschrijven (Oberdorster et al., 2000, Stoeger et al., 2006, Horie et al., 2012, Duffin et al., 2007, Kobayashi et al., 2009, Oberdorster et al., 2005a). Op basis van een dosis uitgedrukt in massa is het risico van nanomaterialen anders dan van niet-nanomaterialen.

Als massa geen geschikte dosismaat is om de blootstelling aan nanomaterialen te beschrijven, wat is dan een geschikte dosismaat? En van welke deeltjeskarakteristieken is de dosismaat afhankelijk?

In hoofdstuk 1 beschrijven we de invloed van verschillende deeltjes-karakteristieken op het ontstaan van ontstekingen in de longen door gebruik te maken van gepubliceerde studies. Verschillende karakteristieken bepalen of nanomaterialen diep in de longen terecht komen, hoe lang het duurt om de deeltjes op te ruimen en of er een reactie optreedt in de longen. Het was niet mogelijk om één eigenschap of dosismaat te vinden die het ontstaan van effecten in de longen kan verklaren en beschrijven voor alle nanomaterialen. Daarom is het doel van deze thesis om voor de risicobeoordeling van nanomaterialen een geschikte dosismaat te vinden die de dosis-effect relatie tussen nanomaterialen en de gezondheid kan beschrijven. Risicobeoordeling is nu vooral gebaseerd op het gebruik van data uit dierexperimenten. Om het aantal dierstudies verder terug te dringen heeft deze thesis ook als doel om alternatieve *in vitro* modellen te ontwikkelen die gebruikt kunnen worden om een geschikte dosismaat te vinden.

Om bovenstaand doel te bereiken zijn de volgende doelstellingen geformuleerd:

1. Het bepalen van de meest geschikte dosismaat om de dosis-response relatie tussen nanomaterialen en gezondheid te beschrijven na inademing
2. Evaluatie van het gebruik van *in vitro* modellen om een geschikte dosismaat voor nanomaterialen te vinden en om de bio-beschikbaarheid te bepalen na inademing
3. Implementatie van de geschikte dosismaat in de risicobeoordeling van nanomaterialen na inademing, inclusief een teststrategie

HET BEPALEN VAN EEN GESCHIKTE DOSISMAAT VOOR NANOMATERIALEN

In zowel dierstudies als *in vitro* studies is de relatie tussen de dosis die toegediend wordt en de dosis die daadwerkelijk op de plaats van een effect komt, de interne dosis, belangrijk. Deze interne dosis bepaalt of er effecten optreden of niet.

In hoofdstuk 2 worden de mogelijkheden en beperkingen van huidige technieken besproken die gebruikt worden om nanomaterialen te detecteren in weefsels, dus om de interne dosis te bepalen. De evaluatie van de aanwezigheid van nanomaterialen in weefsels is niet gemakkelijk. Nanodeeltjes kunnen geïdentificeerd worden met behulp van elektronen microscopie, maar dit is een tijdrovende techniek. Daarom wordt vaak inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) gebruikt om de aanwezigheid van het element te detecteren in plaats van het deeltje zelf. In meerdere monsters kan regelmatig worden gemeten hoeveel er van een bepaald element aanwezig is. Op deze manier kan de verdeling van nanomaterialen over verschillende organen in kaart worden gebracht. De ICP-MS techniek wordt steeds verder geoptimaliseerd om ook deeltjes te kunnen detecteren in plaats van alleen het element. Andere uitdagingen zijn de analyse van nanomaterialen die uit meerdere elementen bestaan, zoals zilver nanodeeltjes met een silica coating.

In hoofdstuk 3 worden de resultaten van een studie gepresenteerd waarin we de invloed van deeltjesgrootte op de effecten na inademing hebben onderzocht. In deze studie werden ratten via inademing blootgesteld aan dezelfde massa zilver nanodeeltjes van 15 nm en 410 nm. Na blootstelling aan de kleine 15 nm zilver nanodeeltjes zagen we een milde ontstekingsreactie in de longen van de ratten. Na een week was er geen reactie meer te zien. De blootstelling aan 410 nm zilver deeltjes veroorzaakte geen effecten in de ratten. De grootte van de deeltjes had dus invloed op de gevonden effecten. Dit kan verklaard worden uit het feit dat kleine nanodeeltjes dieper in de longen terecht komen in vergelijking met grotere deeltjes. Daarnaast lossen de kleine nanodeeltjes sneller op dan de grotere deeltjes. Met behulp van transmissie elektronen microscopie zagen we in longcellen dat de 15 nm deeltjes voor een groot deel waren opgelost tot een grootte <5 nm. Deze studie laat zien dat er een duidelijk verband is tussen deeltjesgrootte en de effecten na inademing, maar de resultaten zijn nog niet voldoende om een geschikte dosismaat voor zilver nanodeeltjes te bepalen.

In hoofdstuk 4 worden de resultaten van een studie beschreven waarin ratten werden blootgesteld aan zilver nanodeeltjes van vier verschillende groottes en in verschillende doseringen. Voor alle deeltjesgroottes zagen we een dosis-afhankelijke toename in longtoxiciteit parameters. Door de data op verschillende manieren te analyseren konden we een geschikte dosismaat voor zilver nanodeeltjes identificeren waarbij de verschillende dosis-response curves van de verschillende deeltjes elkaar overlappen. De totale oppervlakte van de zilver nanodeeltjes die de kleinste longblaasjes (alveoli) bereikten bleek een geschikte dosismaat voor de dosis-response relatie van zilver

nanodeeltjes na inademing. Deze studie laat zien dat het belangrijk is om de interne dosis te meten; wanneer de dosis in de longblaasjes (alveolaire dosis) wordt gebruikt in plaats van de externe dosis vallen de dosis-response curves van de verschillende deeltjes over elkaar, terwijl dit niet gebeurt als je alleen naar de externe dosis in de lucht kijkt. Deze dosismaat kan gebruikt worden om de effecten te voorspellen van zilver nanodeeltjes van een andere grootte dan in deze studie zijn getest. Voor het beschrijven van acute effecten is de totale oppervlakte van de zilver nanodeeltjes (in de alveoli) een geschikte dosismaat. Voor effecten op de lange termijn of chronische effecten kan de dosismaat anders zijn, omdat de kinetiek en het oplossen van de zilver nanodeeltjes dan een rol spelen in de verdeling van zilver over organen en weefsels van het lichaam, waar ze effecten kunnen veroorzaken die niet direct gerelateerd zijn aan de interne alveolaire dosis. Ook voor nanodeeltjes van een andere chemische samenstelling, vorm of coating, die verschillen van de zilver nanodeeltjes in deze studie, kan de geschikte dosismaat anders zijn door verschillen in kinetiek en in de mechanismen die toxiciteit veroorzaken.

EVALUATIE VAN HET GEBRUIK VAN *IN VITRO* MODELLEN

Dierstudies bieden unieke informatie over de verdeling en de effecten van nanomaterialen. Echter, het gebruik van dieren is vanuit ethisch oogpunt gezien niet wenselijk en moet zoveel mogelijk worden beperkt. Bovendien is het niet mogelijk om alle varianten van nanomaterialen in dieren te testen, gezien de enorme verscheidenheid aan nanomaterialen. Om het aantal dierstudies te beperken zijn verschillende *in vitro* modellen ontwikkeld die gebruikt kunnen worden voor het testen van nanomaterialen.

In hoofdstuk 5 wordt de voortgang en toekomst van *in vitro* longmodellen geëvalueerd om de translocatie (passage) van nanomaterialen over de long-bloed barrière te bestuderen. De afgelopen jaren zijn verschillende *in vitro* modellen ontwikkeld om de translocatie van nanomaterialen te bestuderen, omdat er zorgen zijn dat nanodeeltjes de barrières van het menselijk lichaam onbedoeld zouden kunnen passeren en zo het bloed en andere organen kunnen bereiken. Deze *in vitro* modellen variëren in complexiteit van een enkele laag cellen tot de combinatie van meerdere celtypen in een 3D model. Er zijn echter maar een paar studies beschikbaar die het mogelijk maken om de resultaten van *in vitro* modellen te vergelijken met data van dierstudies. Op dit moment kunnen *in vitro* modellen informatie geven over de relatieve mate van translocatie van nanodeeltjes. Het is nog niet mogelijk om de data van *in vitro* modellen te gebruiken om de exacte hoeveelheid nanodeeltjes, die de long-bloed barrière zou kunnen passeren in mensen, te voorspellen. Eenvoudige *in vitro* modellen hebben het voordeel dat ze gemakkelijk op een grote schaal toegepast kunnen worden, terwijl complexe modellen meer op de situatie in de mens lijken. De ontwikkelingen van meer complexe modellen die de menselijke situatie nog beter nabootsen, door co-culturen van verschillende celtypen en het gebruik van microfluidics, lijken veelbelovend.

In hoofdstuk 6 wordt het gebruik van verschillende ‘insert’ membranen geëvalueerd om de translocatie van nanodeeltjes te bestuderen. ‘Insert’ membranen bestaan uit een plastic laag met poriën waar aan de ene zijde longcellen en aan de andere zijde bloedcellen gekweekt kunnen worden om zo de long-bloed barrière na te bootsen. De translocatie van fluorescente polystyreen nanodeeltjes over ‘insert’ membranen, die verschillen in porie-grootte en in membraanmateriaal, is bestudeerd. De translocatie was hoger in ‘inserts’ met grotere poriën vergeleken met kleinere poriën en hoger in polycarbonaat membranen vergeleken met polyester membranen. Fluorescente nanodeeltjes hebben als voordeel dat ze gemakkelijk te detecteren zijn tegen lage kosten. Echter, voor veel van de geteste concentraties was de translocatie van de nanodeeltjes lager dan de detectielimiet van het fluorescente signaal, zelfs wanneer de ‘insert’ membranen zonder cellen werden getest. Voordat translocatie van nanodeeltjes *in vitro* wordt getest, moet eerst worden gekeken of de nanodeeltjes de ‘insert’ membranen kunnen passeren. Daarnaast zijn gevoeliger methoden nodig om de translocatie te meten, zoals ‘fluorescent correlation spectroscopy’, ‘ICP-MS’ of ‘radio-labeling’.

In hoofdstuk 7 wordt aangetoond dat we dezelfde dosismaat voor zilver nanodeeltjes konden vinden als in de bovenstaande dierstudie, de totale oppervlakte van de deeltjes, in een *in vitro* model dat bestaat uit een enkele laag long epitheelcellen. Wanneer we het *in vitro* longmodel complexer maakten door er macrofagen aan toe te voegen en het model te kweken op ‘insert’ membranen, was de correlatie met de dierstudie lager. Een mogelijke verklaring dat de enkele laag long epitheelcellen overeenkomt met de resultaten van de dierstudie is dat er *in vivo* normaal gesproken een vast aantal macrofagen aanwezig is in de longen, ongeveer één macrofaag per alveoli (Gordon and Read, 2002, Kopf et al., 2015). Pas na een blootstelling worden meer macrofagen gerekruteerd. Wanneer deeltjes worden ingeademd en diep in de longen terecht komen, komen ze eerst in contact met long epitheelcellen die vervolgens allerlei stoffen produceren om macrofagen te rekruteren (Stone et al., 2007), maar eerst is er dus contact met de epitheelcellen. De macrofagen in het *in vitro* model nemen de nanodeeltjes op, waardoor ze de dosis die op de epitheelcellen komt verlagen en daarmee ook het effect. Voor het bestuderen van acute effecten van nanodeeltjes is het beter om een enkele laag epitheelcellen te gebruiken dan een co-cultuur met macrofagen. Voor effecten op de lange termijn zijn macrofagen wel belangrijk, omdat nanodeeltjes kunnen oplossen in lysosomen in macrofagen waardoor ionen vrij kunnen komen die de longen kunnen beschadigen. Ook kan de mogelijkheid van de longen om deeltjes op te ruimen worden aangetast wanneer er meer nanodeeltjes in de longen aanwezig zijn dan dat er door de macrofagen kan worden opgeruimd. Dit wordt ook wel ‘lung particle overload’ genoemd. Wanneer de effecten van nanomaterialen worden getest bij ‘overload’, dan zijn de macrofagen een essentieel onderdeel in het model.

In hoofdstuk 8 worden de resultaten van een studie gepresenteerd waarin eerder genoemd *in vitro* longmodel, gekweekt op ‘insert’ membranen, aan zilver nanodeeltjes werd blootgesteld via de lucht. Het doel van deze studie was om te zien of de blootstelling en

effecten van zilver nanodeeltjes via de lucht beter overeenkomen met de *in vivo* situatie dan na blootstelling via kweekmedium. Blootstelling van het longmodel zonder macrofagen aan zilver nanodeeltjes via de lucht veroorzaakte een dosis-afhankelijke toename in toxiciteit en ontstekingsparameters, net zoals *in vivo*, terwijl blootstelling via kweekmedium juist een afname in ontstekingsparameters veroorzaakte. Net zoals bij de eerdere experimenten in kweekmedium zorgde de toevoeging van macrofagen aan het longmodel voor een verlaging van de dosis van zilver nanodeeltjes op de epitheelcellen en dus voor bescherming. Na blootstelling via de lucht werden significante veranderingen in longtoxiciteit parameters gevonden bij doseringen tussen de 0.0025 en 0.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, die overlappen met de doseringen *in vivo* van 0.0001 tot 0.005 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, terwijl er bij blootstelling via kweekmedium veel hogere doseringen tussen 3 en 30 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nodig waren om een significant effect te meten. Deze experimenten, waarin het longmodel werd blootgesteld aan zilver nanodeeltjes via de lucht, zijn slechts één keer uitgevoerd. De experimenten zullen in de toekomst herhaald moeten worden om te bevestigen dat blootstelling via de lucht beter overeenkomt met de *in vivo* situatie dan blootstelling via kweekmedium.

IMPLEMENTATIE VAN DE GESCHIKTE DOSISMAAT

In deze thesis hebben we de totale oppervlakte van zilver nanodeeltjes die de alveoli bereiken geïdentificeerd als een geschikte dosismaat voor het beschrijven van de dosis-response relatie tussen zilver nanodeeltjes en acute effecten na inademing. Deze dosismaat hebben we aangetoond in een dierstudie en in een *in vitro* longmodel dat bestond uit een enkele laag epitheelcellen. Er zijn meerdere verklaringen waarom de deeltjesoppervlakte van de deeltjes die de alveoli bereiken een geschikte dosismaat is: 1) de alveoli is de plaats waar toxiciteit optreedt, 2) zilver nanodeeltjes van verschillende grootte hebben een verschillend depositie patroon in de longen, dus ook in de alveoli (Asgharian et al., 2009), 3) de grootte van de zilver nanodeeltjes heeft invloed op allerlei reacties in de cellen, zoals opname van deeltjes (Zhang et al., 2014), 4) zilver ionen kunnen vrijkomen van het oppervlak van zilver nanodeeltjes (Ma et al., 2012, Leo et al., 2013, Stebounova et al., 2011b, Kent and Vikesland, 2012, Zook et al., 2011) en deze ionen kunnen toxiciteit veroorzaken (Pratsinis et al., 2013, Beer et al., 2012, Wang et al., 2014b, Lubick, 2008, Park et al., 2010), en 5) zilver nanodeeltjes kunnen toxiciteit veroorzaken door direct contact van hun oppervlak met de long epitheelcellen.

Deze dosismaat kan worden gebruikt in risicobeoordeling om de acute effecten te voorspellen van zilver nanodeeltjes van een grootte die niet eerder getest is. Bijvoorbeeld de productie van ontstekingsparameter MCP-1 in de longen was verhoogd met 20% na blootstelling aan $1.7 \times 10^9 \text{ nm}^2$ zilver nanodeeltjes per cm^2 van de alveoli, onafhankelijk van de deeltjesgrootte, terwijl de massa van de geteste deeltjes verschilde (0.000053 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ voor de 18 nm en 0.00010 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ voor de 34 nm deeltjes). Als we nu zilver nanodeeltjes van 74 nm nemen, die niet eerder getest zijn, dan zal de productie van MCP-1 waarschijnlijk ook 20% toenemen na blootstelling aan $1.7 \times 10^9 \text{ nm}^2$ zilver

nanodeeltjes per cm^2 van de alveoli, terwijl de dosis uitgedrukt in massa anders zal zijn vergeleken met de andere deeltjesgroottes ($0.00022 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Voor de risicobeoordeling van nanodeeltjes met andere karakteristieken, zoals andere chemische samenstelling, coating of lading, zal de geschikte dosismaat nog bepaald moeten worden (in studies waarin nanodeeltjes worden getest die verschillen in één karakteristiek) om zo de effecten van andere nanomaterialen ook te kunnen voorspellen.

TESTSTRATEGIE OM DE EFFECTEN VAN NANOMATERIALEN TE SCHATTEN

Er is informatie nodig over zowel de blootstelling aan als ook over de effecten van nanomaterialen voor een juiste risicobeoordeling van nanomaterialen. De effecten van nanomaterialen kunnen worden onderzocht door het uitvoeren van *in vivo* en *in vitro* studies zoals beschreven in deze thesis. Omdat het gebruik van dieren niet wenselijk is en het ook niet mogelijk is om alle verschillende nanomaterialen in dieren te testen, is het belangrijk dat *in vitro* modellen worden gebruikt in de risicobeoordeling van nanomaterialen. Daarom wordt in hoofdstuk 9 een teststrategie gepresenteerd, waarin *in vitro* methoden een centrale rol spelen, om het gevaar van nanomaterialen na inademing te identificeren. De test strategie is bedoeld om de acute effecten te identificeren van nanomaterialen die nog niet (voldoende) zijn getest en van nieuw ontwikkelde nanomaterialen met als doel risico's te kunnen schatten zonder gebruik te maken van dierstudies. Zoals we al eerder beschreven zijn de acute effecten van nanomaterialen na inademing waarschijnlijk (gerelateerd aan) epitheelschade (hoofdstuk 7). Een enkele cellaag van epitheelcellen kan voldoende zijn om de dosismaat van verschillende nanomaterialen te bepalen en zo de acute effecten van nog meer nanomaterialen te voorspellen. Deze informatie kan vervolgens worden gebruikt in de risicobeoordeling van nanomaterialen.

TOEKOMST PERSPECTIEVEN

Informatie over de invloed van deeltjeskarakteristieken op het ontstaan van effecten na inademing kan worden gebruikt voor de ontwikkeling van Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARS) die de effecten van nieuwe nanomaterialen kunnen voorspellen. De data kunnen ook gecombineerd worden in een dataset waarin multivariate analyse uitgevoerd kan worden om zo het samenspel van verschillende deeltjeskarakteristieken te ontdekken die belangrijk zijn voor het ontstaan van effecten in de longen. Uiteindelijk kan informatie over (combinaties van) deeltjeskarakteristieken die gevaarlijk zijn, gebruikt worden om veilige nanomaterialen te ontwikkelen: safe-by-design.

De strategie die we presenteerden in hoofdstuk 9 kan worden gebruikt in de risicobeoordeling van acute effecten van nanomaterialen na kortdurende inademing. *In*

vitro modellen worden vooral gebruikt voor acute blootstellingen die meestal variëren tussen 4 uur en 24 uur. Er zijn echter zorgen dat een levenslange blootstelling aan een lage dosering nanomaterialen effecten kan veroorzaken die pas na jaren zichtbaar worden. De meeste studies (zowel *in vivo* als *in vitro*) focussen op acute effecten en kortdurende blootstelling aan nanomaterialen omdat langdurige studies kostbaar en tijdrovend zijn. Waarschijnlijk zijn de effecten van nanomaterialen na herhaaldelijke of langdurige blootstelling anders dan na acute blootstelling, omdat klaringsmechanismen en secundaire effecten een belangrijkere rol spelen. Daarom zal een enkele cellaag van epitheelcellen waarschijnlijk niet voldoende zijn om de effecten van nanomaterialen te bepalen na herhaaldelijke of langdurige blootstelling. Bovendien zijn *in vitro* modellen meestal gebaseerd op geïmmortaliseerde cellijnen die niet gebruikt kunnen worden voor herhaaldelijke of langdurige blootstelling, omdat ze blijven delen. Een oplossing voor dit probleem zou het gebruik van primaire cellen kunnen zijn, die voor langere tijd gekweekt kunnen worden. Primaire cellen hebben een fenotype dat meer kenmerken heeft die lijken op de cellen in het menselijk lichaam in vergelijking met cellijnen, maar de isolatie van primaire cellen is een uitdaging, ze verschillen van batch tot batch en ze kunnen hun kenmerken verliezen na verloop van tijd. Voor het uitvoeren van herhaaldelijke blootstellingen worden microfluidic systemen ontwikkeld die een mediumstroom gebruiken om de effecten van nanomaterialen te testen onder realistische omstandigheden. De continue mediumstroom brengt voedingsstoffen en neemt afvalstoffen mee en heeft invloed op de opname van nanomaterialen door cellen (Mahto et al., 2015). Daarnaast zorgt de continue mediumstroom voor een homogene blootstelling aan nanomaterialen, terwijl dit in statische systemen niet gebeurt. Voor effecten in de longen is een lung-on-a-chip ontwikkeld waarin mechanische krachten worden gebruikt om de bewegingen tijdens inademing na te bootsen waardoor de opname van nanomaterialen toeneemt (Huh et al., 2010). De combinatie van deze microfluidics met primaire cellen is een veelbelovende methode om de effecten van nanomaterialen na herhaaldelijke of langdurige blootstelling te meten zonder gebruik te maken van dieren.

Samengevat, er is behoefte aan een adequate risicobeoordeling van nanomaterialen na inademing omdat er steeds meer nanomaterialen worden toegepast in consumenten producten. Het is niet mogelijk om binnen de enorme verscheidenheid aan nanomaterialen alle verschillende nanomaterialen apart te testen om zo de gevaren in te schatten. In deze thesis hebben wij de totale oppervlakte van zilver nanodeeltjes die de alveoli bereiken geïdentificeerd als de geschikte dosismaat om de acute effecten van zilver nanodeeltjes te beschrijven na zowel inademing door dieren als na blootstelling van een epitheel cellaag *in vitro*. Voor andere nanomaterialen, die verschillen in één karakteristiek, kan op dezelfde manier een geschikte dosismaat worden gevonden. Uiteindelijk kan hiervoor de epitheel cellaag gebruikt worden om dierstudies te verminderen. De geschikte dosismaat kan worden gebruikt om de effecten te voorspellen van nanomaterialen die niet eerder getest zijn. Daarnaast kan de informatie worden gebruikt om nanomaterialen te categoriseren op basis van hun

gevaar voor de gezondheid. Dit kan worden vergeleken met de huidige blootstelling aan nanomaterialen door zowel werknemers als consumenten om zo de acute risico's voor de gezondheid in te schatten. Voor effecten na herhaaldelijke of langdurige blootstelling zullen *in vitro* systemen die meer op de mens lijken, zoals microfluidics, verder geoptimaliseerd moeten worden.

